

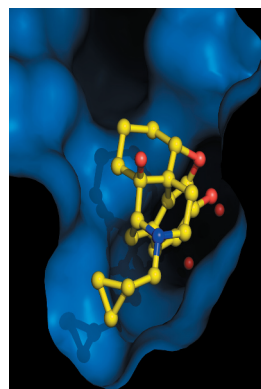
► Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la plus grande famille de récepteurs de surface régulant l'ensemble des fonctions physiologiques et constituent aujourd'hui des cibles médicamenteuses majeures. Jusqu'à récemment, le mode de fonctionnement de ces récepteurs était assimilé à un interrupteur *on/off*, présentant le ligand physiologique agoniste comme capable d'allumer l'ensemble des voies de signalisation associées à ce récepteur. Le concept d'agonisme biaisé a laissé place très récemment à la notion de sélectivité fonctionnelle des ligands, capables de privilégier l'activation d'une voie de signalisation particulière par rapport à une autre et, potentiellement, d'améliorer l'efficacité des médicaments en diminuant les effets secondaires indésirables. Néanmoins, la publication récente de nouveaux biosenseurs ultrasensibles capables de sonder les premiers événements de la signalisation en aval du récepteur actif, associés à l'analyse d'effecteurs de la signalisation plus en aval viennent remettre en question la définition de l'agonisme biaisé. Cette synthèse fait le point sur l'importance de la sensibilité des essais fonctionnels dans l'identification des agonistes biaisés et sur les stratégies futures de cartographie pharmacologique permettant la sélection de candidats médicaments aux effets thérapeutiques optimisés. ◀

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent une des plus grandes familles de récepteurs cellulaires de surface. Ils assurent la conversion de signaux extracellulaires de nature très diverse en signaux intracellulaires, conduisant à la réponse cellulaire et, *in fine*, à la réponse physiologique. Régulant la plupart des processus physiologiques, ils constituent de ce fait une cible médicamenteuse essentielle couvrant aujourd'hui environ 40 % du marché du médicament. Si

Plasticité des récepteurs couplés aux protéines G et signalisation

Un Rubik's cube ?

Céline Galés



Inserm/UPS UMR 1048, Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC), 1, avenue Jean-Poulhès, BP84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France.
celine.gales@inserm.fr

les ligands/médicaments ciblant les RCPG représentent des molécules thérapeutiques efficaces, connaît-on réellement leur mode de fonctionnement ? L'apparition récente de nouveaux concepts en pharmacologie laisse quelque peu perplexe.

De l'agonisme vers un agonisme biaisé

Pendant très longtemps, la pharmacologie classique des RCPG définissait la notion d'agonisme comme la capacité d'un ligand à déclencher l'activation simultanée de l'ensemble des voies de signalisation spécifiques de son récepteur (*Figure 1A*). Plus récemment, cette notion a laissé place au concept « d'agonisme biaisé », selon lequel des ligands sélectifs pour un même récepteur sont capables de sélectionner certaines voies de signalisation associées à ce récepteur [1] (*Figure 1B*) ; cette sélectivité est susceptible d'entraîner des effets physiologiques particuliers. Cette révolution pharmacologique ouvre ainsi la possibilité d'affiner les effets des médicaments ciblant les RCPG en créant des molécules spécifiques d'une voie de signalisation, permettant ainsi de diminuer les effets secondaires indésirables souvent associés [2].

Selon le concept d'agonisme biaisé, il apparaît que l'efficacité d'un ligand ne dépend plus d'un couple unique ligand-récepteur, mais d'un trinôme ligand-récepteur-effecteur, soulignant l'efficacité pluridimensionnelle des ligands [3]. L'identification des ligands agonistes biaisés pose alors la question du choix de l'effecteur dans les stratégies de criblage de ces molécules. La signalisation pléiotrope des RCPG n'est pas sans compliquer ce choix. Jusqu'à présent, et de façon quelque peu simpliste en raison des multiples voies de signalisation et de régulation associées à l'activation d'un RCPG,

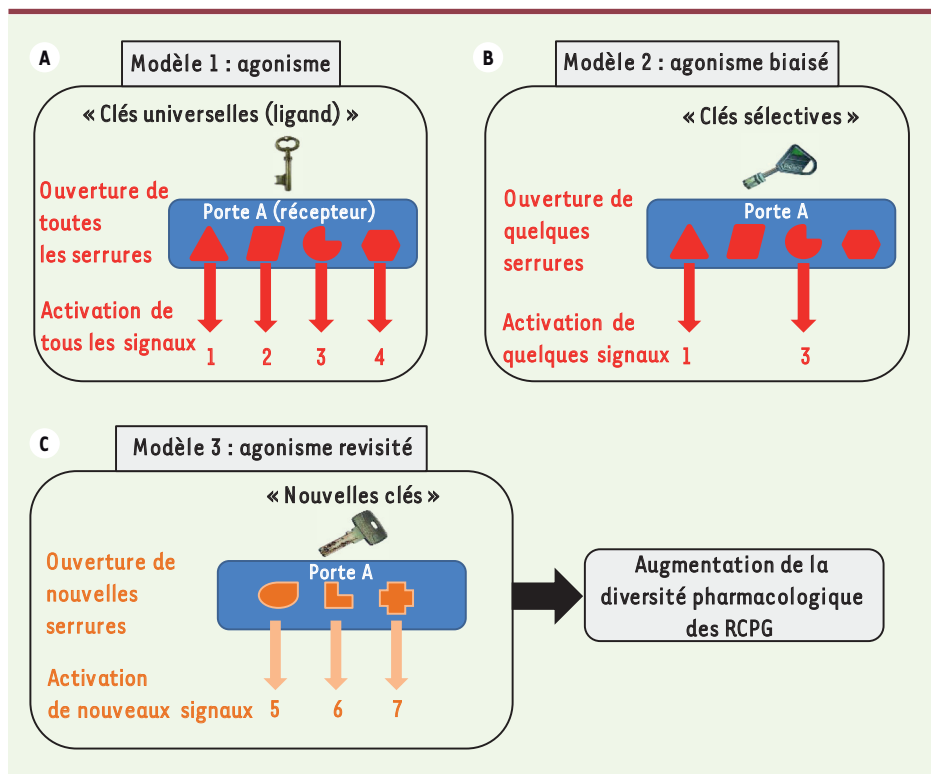


Figure 1. Évolution du concept d'agonisme. **A.** Modèle 1 : définition classique d'un ligand agoniste (clefs universelles) d'un RCPG (porte A). Le ligand active simultanément toutes les voies de signalisation intracellulaires (1, 2, 3 et 4) associées au RCPG. **B.** Modèle 2 : le modèle classique a laissé place au concept d'agoniste biaisé, définissant le ligand agoniste comme capable de sélectionner uniquement l'activation de certaines voies de signalisation (1 et 3). **C.** Modèle 3 : les travaux de Saulière *et al.* [7] démontrent que certains agonistes sélectifs d'un RCPG activent des voies de signalisation jusque-là inconnues avec l'agoniste physiologique. Cette découverte démontre la grande plasticité des RCPG et ouvre la porte à la caractérisation d'une très grande diversité d'entités de ces récepteurs.

la signalisation des RCPG a été simplifiée selon un schéma divisé en voies dépendantes des protéines G hétérotrimériques, et voies indépendantes des protéines G mais dépendantes de la β -arrestine [4] (deux effecteurs proches du récepteur dans la membrane plasmique). De manière surprenante, jusqu'à présent on a décrit très peu de ligands biaisés mettant en jeu l'activation des protéines G par opposition à celle de la β -arrestine. C'est curieux puisque les protéines G constituent l'effecteur intracellulaire commun à toutes les familles de RCPG, et surtout l'étape initiale en réponse à la liaison d'un agoniste sur le récepteur et qui déclenche l'activation des voies de signalisation dans la cellule. Dans notre équipe, nous avons émis l'hypothèse que l'un des problèmes majeurs résidait dans l'absence d'essais sensibles et directs pour mesurer l'activation des protéines G [5].

Agonisme biaisé ou insensibilité des essais fonctionnels ?

La qualification d'agoniste biaisé pour un ligand de RCPG n'est pas sans faille puisqu'elle dépend uniquement de la mesure de l'activité des effecteurs intracellulaires associés à un récepteur. Une autre difficulté provient également de la faible efficacité des ligands biaisés nécessitant l'utilisation d'essais extrêmement sensibles pour leur identification.

Les RCPG sont capables d'interagir avec de multiples isoformes de protéines G, néanmoins aujourd'hui, aucun essai ne permet d'apprécier de manière sensible et directe l'activation individuelle de chacune de ces isoformes. Classiquement, l'activation directe des

protéines G est mesurée uniquement par liaison du [35 S]-GTP γ S sur des fractions membranaires de cellules. Mais elle reste très peu sensible (bruit de fond très élevé) et restreinte essentiellement à l'analyse de la famille Gi (inhibitrice) sans distinguer parmi les différentes isoformes constituant cette famille [5]. Une autre méthode plus largement utilisée est la mesure indirecte de l'activation des effecteurs de la protéine G (adénylate cyclase, phospholipase C, etc.) [5]. Elle représente aujourd'hui l'essai privilégié pour l'évaluation d'activité biaisée des ligands. Cependant, ces méthodes dépendent de l'amplification du signal cellulaire et ne sont pas adaptées à la mesure de signaux compartimentalisés dans la cellule. Par opposition, les essais mesurant l'activation de la β -arrestine sont plus fiables et basés sur la mesure de la translocation de cette protéine cytosolique au niveau du RCPG membranaire, soit par imagerie confocale en immunofluorescence, soit par des essais utilisant le transfert d'énergie par résonance (BRET [*bioluminescence resonance energy transfer*] ou FRET [*fluorescence resonance energy transfer*]), et mesurant l'interaction directe entre le récepteur et la β -arrestine [6]. Ces différences dans la sensibilité des essais pourraient ainsi rendre compte de la différence existant entre le nombre d'agonistes biaisés entre la voie β -arrestine et la voie des protéines G.



Les agonistes biaisés existent-ils réellement ? Le développement récent d'essais plus sensibles nous ouvre les yeux

Nous avons développé récemment des sondes basées sur la technique BRET et la proximité entre la sous-unité $G\alpha$ et $G\gamma$ qui, pour la première fois, permettent de mesurer l'activation directe de toutes les familles de protéines G ($G_{i/o}$, G_s , $G_{q/11}$, $G_{12/13}$) en temps réel et dans des cellules vivantes [7]. De façon étonnante, nous avons montré grâce à ces sondes que le populaire peptide synthétique SII dérivé de l'angiotensine II (AngII) et décrit comme un agoniste biaisé de la voie β -arrestine du récepteur angiotensine I (AT1) qui lie l'AngII [8], présentait des caractéristiques d'agoniste partiel pour l'activation des protéines G comparé à l'agoniste physiologique AngII. La surprise ne s'arrêtait pas là puisque, dans un second temps, nous avons validé l'implication des protéines G endogènes en mesurant l'activation de leurs effecteurs secondaires directs (adénylate cyclase, phospholipase C) ou, plus en aval, *extracellular signal-related kinases 1/2* (Erk1/2), et démontré que les deux molécules SII et AngII activent le récepteur AT1 selon deux modes opératoires totalement différents, chacun impliquant les protéines G et la β -arrestine. Lorsque l'on analyse en BRET la conformation du complexe formé entre le récepteur AT1 et les protéines G, chacun des ligands stabilise une structure spécifique du complexe très probablement à l'origine d'une signalisation intracellulaire différente. Aussi, contrairement au dogme établi, le SII ne mime pas une partie de l'agoniste physiologique AngII, mais induit une nouvelle entité active du récepteur AT1 [7].

Il apparaît ainsi que des agonistes sélectifs d'un même récepteur sont capables de stabiliser le récepteur vers un mode de signalisation particulière, jusqu'alors inconnu en référence à l'agoniste physiologique (Figure 1C). Ces ligands permettent donc de créer de nouvelles entités pharmacologiques en utilisant un même récepteur. Cette découverte démontre la grande plasticité des RCPG et ouvre la porte à la caractérisation d'une très grande diversité d'entités de ces récepteurs. Elle pose aussi la question de l'existence réelle des agonistes biaisés. Chaque couple ligand-récepteur ne représente-t-il pas une entité pharmacologique unique ? Quelle est maintenant la relevance physiologique de chacune de ces entités récepteurs ? Dans le futur, la dissection des différentes voies de signalisation en aval du récepteur devrait permettre d'avancer dans cette réflexion. Elle nécessitera non plus une analyse unique de différents effecteurs telle que la préconisait le concept d'agonisme biaisé, mais plutôt la dissection des mécanismes moléculaires conduisant à l'activation de ces effecteurs (protéine G, β -arrestine). Par ailleurs, cette nouvelle vision indique que le choix de l'effecteur pour la caractérisation pharmacologique des ligands ne doit plus être cantonné aux effecteurs classiquement associés à un récepteur, mais étendu à un panel d'effecteurs beaucoup plus large. ♦

SUMMARY

G-protein-coupled receptors plasticity and signalling

GPCRs represent the largest cell surface receptor family, regulating all physiological functions and thus constitute major drug targets. Until recently, the receptor was believed to work as an ON-OFF switch able to promote activation of all signaling cascades associated with this receptor. The new concept of biased agonism led recently to the notion of functional selectivity of ligands favoring the activation of specific signaling pathways, thus paving the way for developing pathway-specific drugs with increased efficacy and decreased side effects. However, recent publication of new biosensors with high sensitivity probing the first signaling events close to the active receptor and combined with the analysis of the activation of more downstream effectors has challenged the definition of biased agonism. This review highlights the importance of discriminant functional assays for biased ligands screening and the future strategies for pharmacological mapping optimization aiming to select new drugs with enhanced therapeutic effects. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Kenakin T. Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* 1995 ; 16 : 232-8.
2. Allen JA, Yost JM, Setola V, et al. Discovery of beta-arrestin-biased dopamine D2 ligands for probing signal transduction pathways essential for antipsychotic efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 108 : 18488-93.
3. Galandrin S, Bouvier M. Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol* 2006 ; 70 : 1575-84.
4. Whalen EJ, Rajagopal S, Lefkowitz RJ. Therapeutic potential of beta-arrestin and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med* 2011 ; 17 : 126-39.
5. Denis C, Saulière A, Galandrin S, et al. Probing heterotrimeric G protein activation: applications to biased ligands. *Curr Pharm Des* 2012 ; 18 : 128-44.
6. Verkaar F, van Rosmalen JW, Blomenröhr M, et al. G protein-independent cell-based assays for drug discovery on seven-transmembrane receptors. *Biotechnol Annu Rev* 2008 ; 14 : 253-74.
7. Saulière A, Bellot M, Paris H, et al. Deciphering biased-agonism complexity reveals a new active AT(1) receptor entity. *Nat Chem Biol* 2012 (sous presse).
8. Wei H, Ahn S, Shenoy SK, et al. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 10782-7.

TIRÉS À PART

C. Galès



Tarifs d'abonnement m/s - 2012

**Abonnez-vous
à médecine/sciences**

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès
des sciences biologiques et médicales

**Bulletin d'abonnement
page 804 dans ce numéro de m/s**

